



Bioorthogonale enzymatische Aktivierung maskierter Verbindungen

Cornelia Ritter, Nathalie Nett, Carlos G. Acevedo-Rocha, Richard Lonsdale, Katja Kräling, Felix Dempwolff, Sabrina Hoebenreich, Peter L. Graumann, Manfred T. Reetz* und Eric Meggers*

Abstract: Wir berichten über die Verwendung evolvierten Varianten von Cytochrom-P450-Monooxygenasen als hochaktive und hochselektive Katalysatoren für die bioorthogonale Aktivierung Propargylether- und Benzylether-maskierter Substrate, einschließlich der erfolgreichen Entschützung in lebenden *E. coli*. Docking-Studien und Moleküldynamik-Simulationen stützen die beobachtete Selektivität. Diese Studie veranschaulicht den möglichen Nutzen von bioorthogonalen Paaren aus Enzym und Schutzgruppe für Anwendungen in den Lebenswissenschaften.

Bioorthogonale Chemie ermöglicht die Ausführung chemischer Reaktionen innerhalb lebender Zellen, ohne dabei inhärente biochemische Prozesse zu beeinflussen.^[1] Während der Fokus zunächst auf stöchiometrischen und unkatalysierten Reaktionen lag, zielen neueste Bestrebungen auf die Verwendung geeigneter Katalysatoren ab. Idealerweise sollen diese in der Natur unübliche funktionelle Gruppen erkennen und deren Transformation innerhalb eines komplexen biologischen Systems selektiv herbeiführen.^[2-6] Bei allen Vorteilen solcher Systeme stellt die Balance zwischen hoher Aktivität bei niedrigen Substratkonzentrationen einerseits, und Unreaktivität gegenüber zahllosen zellulären Molekülen andererseits, eine anspruchsvolle Herausforderung bei der Entwicklung von Katalysatoren dar. Entsprechend selten sind Berichte zu künstlich erzeugten bioorthogonalen Katalysatoren mit hoher Umsatzrate.^[2]

Der unbestreitbare Vorteil der Signalverstärkung durch katalytischen Umsatz wurde bereits auf dem Gebiet der enzymatisierten biologischen Bildgebung und Detektion erfolgreich gezeigt.^[7] Enzyme entwickelten sich in der Natur über Millionen von Jahren hinweg zu hocheffizienten Biokatalysatoren, die perfekt an ihre Aufgabe im biologischen Kontext angepasst sind. Dieser evolutionäre Entwicklungsprozess kann im Labor simuliert werden, und mittels gerichteter Evolution^[8] können die Eigenschaften von Enzymen an vom Menschen definierte Umgebungs- oder Reaktionsbedingungen angepasst werden. Darunter fallen beispielsweise die Verbesserung der thermischen oder chemischen Stabilität sowie die Steuerung von Stereo- und Regioselektivität beim Umsatz natürlicher und nichtnatürlicher Substrate. Daher postulierten wir, dass im Labor evolvierte Enzyme neue Werkzeuge für die bioorthogonale Chemie darstellen könnten, indem sie selektiv die Abspaltung von Schutzgruppen innerhalb lebender Zellen katalysieren, deren chemische Bindung von natürlichen Enzymen nicht gebrochen werden kann (Abbildung 1). Solche Paare aus Enzym und Schutzgruppe haben das Potenzial, leistungsbezogene Nachteile auszuräumen, wie sie in chemisch oder durch Licht induzierten Entschützungen derzeitig beobachtet werden.^[2,9]

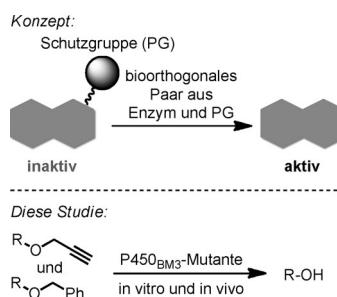


Abbildung 1. Konzept der bioorthogonalen enzymatischen Entschützung maskierter Verbindungen durch P450-katalysierte oxidative Spaltung von Propargylether- und Benzylether-Schutzgruppen.

- [*] C. Ritter, N. Nett, Dr. C. G. Acevedo-Rocha, Dr. R. Lonsdale, K. Kräling, S. Hoebenreich, Prof. Dr. P. L. Graumann, Prof. Dr. M. T. Reetz, Prof. Dr. E. Meggers
Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg
Hans-Meerwein-Straße 4, 35043 Marburg (Deutschland)
E-Mail: meggers@chemie.uni-marburg.de
Dr. C. G. Acevedo-Rocha, Dr. R. Lonsdale, Prof. Dr. M. T. Reetz
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)
E-Mail: reetz@mpi-muelheim.mpg.de
Dr. C. G. Acevedo-Rocha, Dr. F. Dempwolff, Prof. Dr. P. L. Graumann
LOEWE-Zentrum für Synthetische Mikrobiologie (SYNMIKRO)
Hans-Meerwein-Straße, 35043 Marburg (Deutschland)
Dr. C. G. Acevedo-Rocha
Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie
Karl-von-Frisch-Straße 10, 35043 Marburg (Deutschland)
Prof. Dr. E. Meggers
College of Chemistry and Chemical Engineering
Xiamen University, Xiamen 361005 (China)
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201506739> zu finden.

Zunächst wurden passende Paare aus Enzym und Schutzgruppe identifiziert, die im besten Fall Bioorthogonalität vorweisen sollten, d.h. die Schutzgruppe ist völlig stabil in der biologischen Umgebung und wird effizient und selektiv ausschließlich vom ausgewählten, evolvierten Enzym gespalten. Basierend auf diesen Kriterien stellten wir die Hypothese auf, dass nichtnatürliche Propargylether als Schutzgruppe für Alkoholfunktionen nicht von natürlichen Enzymen gespalten werden können und nur die von uns evolvierten Varianten einer Cytochrom-P450-Monooxygenase

(CYP) dazu in der Lage sind (siehe Schema S1 in den Hintergrundinformationen für Details zum Mechanismus).

Als Modellsystem wählten wir P450_{BM3}, eine lösliche Fettsäure-Hydroxylase aus *Bacillus megaterium*.^[10] Die Selektivität und Anpassungsfähigkeit dieses hochaktiven Biokatalysators wurde bereits in vielfältigen Studien gezeigt.^[11,12] P450_{BM3} bildet mit seiner Reduktase ein Fusionsprotein, wodurch es lediglich die Anwesenheit von Sauerstoff und NADPH für die Katalyse benötigt.

Als Beispielsubstrate wählten wir die ethergeschützten Fluorophore **1–3**, die nach Entschützung ihre Fluoreszenz zurückgewinnen, sodass die erfolgreiche Abspaltung der Schutzgruppe direkt durch Fluoreszenzmessungen verfolgt werden konnte. Basierend auf literaturbekannten Methoden^[13,14] wurden über 1000 bekannte P450_{BM3}-Enzymvarianten getestet, die zuvor für die Hydroxylierung hydrophober Verbindungen erzeugt worden waren (siehe die Hintergrundinformationen für Details).

Zunächst wurden das Bis(propargylether)-Derivat von Fluorescein (**1a**) sowie das Allyl- (**1b**) und Benzyl-Derivat (**1c**; Abbildung 2) im Bibliotheksscreening auf Fluoreszenz-

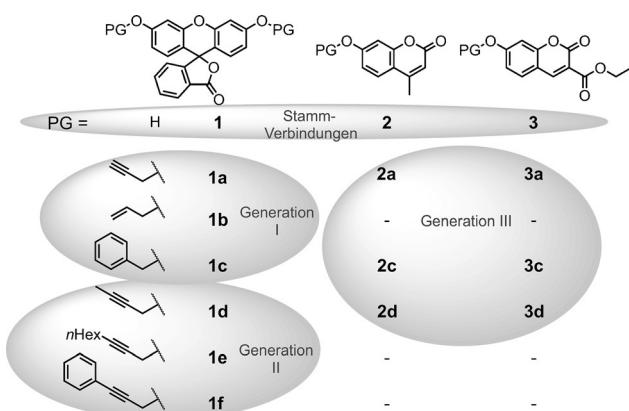


Abbildung 2. Getestete Modellverbindungen. Verbindungen der ersten und zweiten Generation sind Fluorescein-Derivate, während die dritte Generation auf Cumarinen aufbaut.

entwicklung durch P450_{BM3}-Mutanten hin untersucht. Wie in Abbildung 3 zu sehen, konnten nur wenige Enzymvarianten gefunden werden, die das Allylderivat **1b** umsetzen, und überhaupt keine für den Bis(benzylether) **1c**. Allerdings zeigen einige Enzymvarianten eine bemerkenswert hohe Aktivität gegenüber der Spaltung des Bis(propargylethers) **1a**, wobei das beste Beispiel die Mutante TFFIS darstellt (Mutationen: R47T/S72F/A82F/F87I/L437S). Wichtig dabei ist, dass die Mutante TFFIS den Bis(propargylether) **1a** gegenüber **1b** (schwache Aktivierung) und **1c** (keine Aktivierung) stark bevorzugt, während der P450_{BM3}-Wildtyp (wt) nicht fähig ist, **1a–c** zu aktivieren, sodass ein beeindruckendes Maß an Selektivität auftritt. Die HPLC-gestützte Analyse beweist die Mono-Entschützung von **1a** (siehe Abbildung S1). Die ausgeprägte Eignung der Propargyl-Schutzgruppe wird besonders im Experiment der Alkin-Derivate **1d–f** klar ersichtlich: Während eine große Zahl an Varianten eine schwache Aktivität gegenüber dem Bis(2-butinylether)

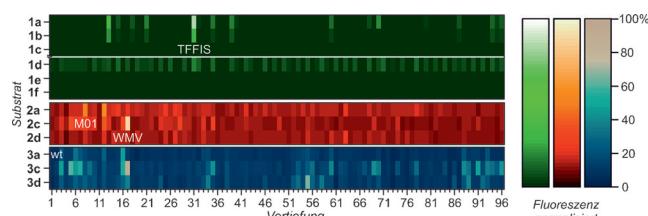


Abbildung 3. Beobachtete Aktivität von P450_{BM3}-Mutanten (angeordnet im 96-Titerplatten-Format) gegenüber verschiedenen maskierten Substraten. Gezeigt sind Ergebnisse für Fluorescein- (**1a–f**, grün) und Cumarin-basierte Substrate (**2a–c**, rot und **3a–c**, blau) aus dem Bibliotheksscreening. Fluoreszenzintensitäten sind auf die höchsten/niedrigsten Werte normiert, die auf den Platten verzeichnet wurden. Hellere Farben zeigen höhere Intensitäten an (Messwerte siehe die Hintergrundinformationen, Anhang).

1d zeigen, konnten für die Alkine **1e** und **1f** keine aktiven Enzymvarianten gefunden werden (Abbildung 2 und 3).

Angespornt von diesen Ergebnissen wurden die Propargylether-Derivate (**2a** und **3a**) zweier Cumarine untersucht, sowie die entsprechenden 2-Butinyl- (**2d** und **3d**) und Benzyl-Derivate (**2c** und **3c**). Beachtenswert ist, dass 4-Methylumbelliferon (**2**) ein etablierter Wirkstoff ist, der zur Behandlung von Gallenblasenerkrankungen^[15] eingesetzt wird und auch für seine krebshemmende Aktivität gegenüber multiplen Krebstypen bekannt ist.^[16] Ferner fungiert der Ethoxyether von **2** als Sonde für die Bestimmung von humanen CYP-Werten in klinischen Proben.^[17] Die zweite Modellverbindung, 3-Carboxycumarin (**3**), ist ein Substrat für ähnliche von P450_{BM3}-Varianten katalysierte Reaktionen.^[18] Im Screening zeigt die Mutante M01 (R47L/F87V/L188Q/E267V/G415S)^[19] die Fähigkeit, die Propargylether **2a** und **3a** zu aktivieren, während die Mutante WMV (R47W/A82M/F82V) eine extrem hohe Aktivität gegenüber den Benzylethern **2c** und **3c** aufweist. Diese Ergebnisse sind insofern besonders bemerkenswert, da Alkine als Suizid-Substrate durch die Alkylierung der Häm-Gruppe CYPs irreversibel inhibieren.^[20]

Drei Enzymvarianten wurden als vielversprechend identifiziert, aufgereinigt und biochemisch charakterisiert, wobei definierte Enzymkonzentrationen unter sonst unveränderten Screening-Bedingungen eingesetzt wurden (siehe die Hintergrundinformationen). Somit war es möglich, Aktivitätsunterschiede abzulegen, die in Lysaten durch Abweichungen im Expressionsniveau entstehen, um so die interessantesten Treffer-Mutanten direkt zu vergleichen (Abbildung 4): Im Fall von Substrat **1a** erreicht die aktivste Mutante TFFIS eine im Vergleich zum wt 52-fach erhöhte Fluoreszenz, was einer Umsatzzahl („turnover number“, TON) von 425 entspricht. Die Michaelis-Menten-Parameter K_M und k_{cat} betragen $3.7 \mu\text{M}$ bzw. 0.26 s^{-1} ($k_{cat}/K_M = 70.3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Keiner der anderen Treffer ist fähig, Fluoresceinderivate umzusetzen. Während die hochaktive Mutante WMV (für **3d**: $\text{TON} > 5000$, $K_M = 7.2 \mu\text{M}$, $k_{cat} = 550 \text{ s}^{-1}$; $k_{cat}/K_M = 7.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) alle Cumarin-basierten Substrate aktiviert (**2a**, **2c**, **3c**, und **3d**), zeigt die selektivere Mutante M01 lediglich Aktivität gegenüber den Substraten **2a** und **2c**, bei etwa 4-fach höherer Aktivität als der wt (TON = 47). Dies bedeutet, dass verschiedene Mutanten selbst Verbindungen mit sehr ähnlicher

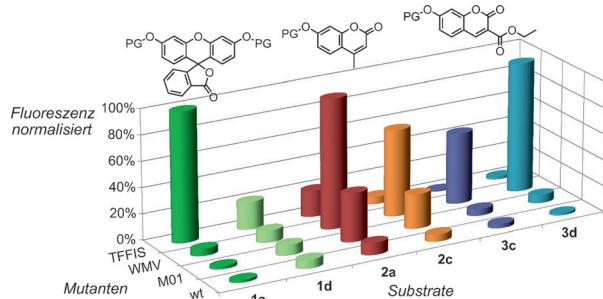


Abbildung 4. Ergebnisse der In-vitro-Charakterisierung. Enzymaktivität der besten identifizierten $\text{P}450_{\text{BM}3}$ -Varianten gegenüber deren maskierten Substraten, bei konstanten Enzymkonzentrationen (generell 100 nm), normalisiert auf die höchste verzeichnete Fluoreszenz für jede Stammverbindung (Messdaten siehe die Hintergrundinformationen, Anhang 2).

Kernstruktur unterscheiden können, wobei diese Selektivität mit verminderter Aktivität einhergeht, denn WMV zeigt eine 16-fach höhere Aktivität als M01 mit Substrat **3d**. Frühere Berichte erreichten nach einer Runde der gerichteten Evolution mittels fehlerhafter PCR eine 7-fache Steigerung des Umsatzes von **3c** mit einer anderen $\text{P}450_{\text{BM}3}$ -Mutante, bei ähnlichen Konzentrationen in einem anderen Puffersystem.^[18c,21] Unsere Variantenbibliotheken hingegen stammen aus Studien, in denen gezielt das aktive Zentrum nach empfohlenen Methoden^[22] modifiziert wurde.

Um Einblicke in strukturelle Aspekte der Bindungsmodi und Substratselektivitäten der aktivsten Enzym-Substrat-Paare TFFIS/**1a** und WMV/**3d** zu gewinnen, wurden Docking-Studien und Moleküldynamik(MD)-Simulationen durchgeführt (Abbildung 5; siehe die Hintergrundinformationen für Einzelheiten). Da keine Kristallstrukturen der beiden Enzymvarianten bekannt sind, wurden die entsprechenden Mutationen ausgehend von der Kristallstruktur des wt rechnerisch erzeugt (PDB-Code 1BU7).^[23] In beiden Fällen konnten stabile Bindungsmodi der Substrate erhalten werden.

Die dabei beobachteten Substratpositionen in der aktiven Tasche orientieren die Schutzgruppe für die Hydroxylierung durch die oxidierende Eisen-Oxo-Spezies („Compound I“). Der aktive Bindungsmodus von **1a** in TFFIS (Abbildung 5a,

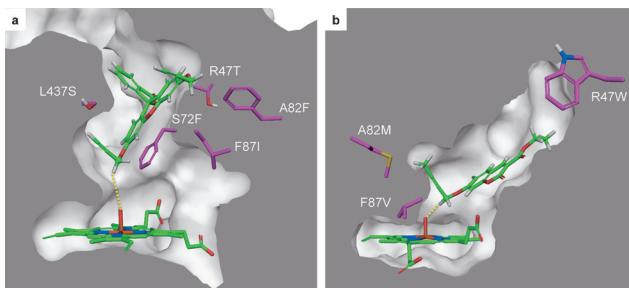


Abbildung 5. Ergebnisse der Simulationen. Erhaltene Docking-Positionen für a) Substrat **1a** in Mutante TFFIS, und b) Substrat **3d** in Mutante WMV. Abstände $r(\text{O}-\text{H})$ zwischen Substraten und aktivem Zentrum betragen 3.64 Å bzw. 2.29 Å. Hervorgehoben sind die oxidierten prosthetischen Häm-Gruppen, Substrate und die mutierten Aminosäuren.

$r(\text{O}-\text{H})$ 3.64 Å) wird durch eine $\pi-\pi$ -Wechselwirkung mit der Seitenkette S72F stabilisiert. Das Substrat **3d** hingegen kann tief in die aktive Tasche von WMV vordringen (Abbildung 5b, $r(\text{O}-\text{H})$ 2.29 Å), sodass das Wasserstoffatom der Methylengruppe nahe an der Häm-Gruppe positioniert wird und so eine schnelle Umsetzung ermöglicht, was sich mit den experimentell beobachteten kinetischen Daten deckt (siehe Tabelle S3). Alle Treffer-Mutanten verfügen über eine Mutation an Position R47, deren entscheidende Rolle bei der Substratbindung bereits diskutiert wurde:^[24] Als einzige geladene Seitenkette innerhalb der Bindungstasche hat ein Austausch durch polar-neutrale oder sogar aliphatische Aminosäuren, wie in diesem Fall, einen großen Einfluss auf die Effizienz.

Des Weiteren wurde die Fähigkeit der Treffer-Mutanten untersucht, Modellverbindungen auch in lebenden *E. coli* zu entschützen (Abbildung 6). Eine hohe Fluoreszenzintensität

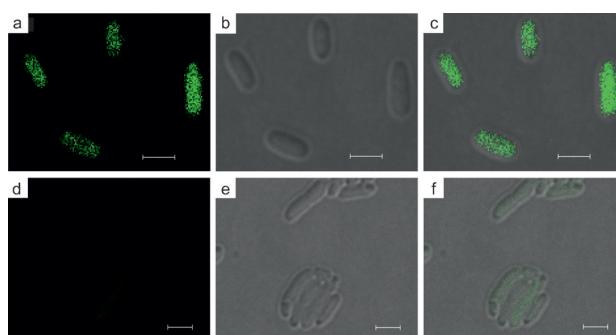


Abbildung 6. Experimente in lebenden Zellen. TFFIS exprimierende *E. coli* (oben) zeigen ein intensives Fluoreszenzsignal, das die Entschützung des Substrates **1a** anzeigt. Dabei wird kein signifikantes Signal im wt detektiert (unten). Gezeigt sind der Fluoreszenzkanal (links), der optische Kanal (Mitte) und eine Überlagerung beider Kanäle (rechts). Maßstab: 2 μm.

innerhalb der Zellen wird für **1a** beobachtet, einhergehend mit wenig Efflux, wie aus der Analyse vom Medium und Lysaten ersichtlich wird (siehe Abbildung S3). Entgegen den Erwartungen aufgrund der früheren Studie von Ruff et al.^[18c] ist es nicht möglich, auf diese Weise auch die Cumarinsubstrate (**3**) zu verfolgen. Der hohe Efflux von **3** verhindert mikroskopische Aufnahmen durch einen zu hohen Fluoreszenzhintergrund, auch nach wiederholtem Waschen der Zellen. Somit sind zwar die Cumarin-basierten Substrate, im Unterschied zu dem Fluoresceinderivat **1a**, nicht für mikroskopische Aufnahmen geeignet, dennoch sind die Reaktionen innerhalb der lebenden Zellen in allen geprüften Fällen erfolgreich.

Zusammenfassend berichten wir über die erfolgreiche Identifizierung evolierter CYP-Varianten, die fähig sind, effizient und selektiv Verbindungen zu entschützen, die mittels Propargylether- und Benzylether-Schutzgruppen maskiert sind. Docking-Studien und Moleküldynamik-Simulationen stützen die experimentellen Beobachtungen zur Selektivität der besten beiden Mutanten. Beachtenswert ist die erfolgreiche Entschüttungsreaktion innerhalb lebender *E.*

coli durch die rekombinant exprimierten P450_{BM3}-Varianten. Solche bioorthogonalen Paare von Enzym und Schutzgruppe könnten in den Lebenswissenschaften Anwendung finden, beispielsweise für die Freisetzung bildgebender Substanzen oder zur katalytischen Aktivierung von Wirkstoffvorläufern an deren Zielort.

Danksagung

Diese Studie wurde von einem LOEWE-Schwerpunktprogramm des Landes Hessen (SynChemBio), der Philipps-Universität Marburg und der Max-Planck-Gesellschaft unterstützt.

Stichwörter: Bioorthogonalität · Cytochrome · Maskierung · Proteindesign · Schutzgruppen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13440–13443
Angew. Chem. **2015**, *127*, 13640–13644

- [1] a) M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974–6998; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108–7133; b) D. M. Patterson, L. A. Nazarova, J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 592–605; c) C. S. McKay, M. G. Finn, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1075–1101; d) A. Bormann, J. C. M. van Hest, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2123–2134; e) S. S. Matikonda, D. L. Orsi, V. Staudacher, I. A. Jenkins, F. Fiedler, J. Chen, A. B. Gamble, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 1212–1218.
- [2] Übersichtsartikel zu Metallkomplexen innerhalb biologischer Systeme: a) É. Csajbók, F. Joó in *Organometallic Chirality* (Hrsg.: G. Pályi, C. Zucchi, L. Caglioti), Muchi Editore, Modena, **2008**, S. 69–86; b) P. K. Sasmal, C. N. Streu, E. Meggers, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1581–1587; c) M. Yang, J. Li, P. R. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 6511–6526; d) T. Völker, E. Meggers, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *25*, 48–54.
- [3] a) C. Streu, E. Meggers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5645–5648; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5773–5776; b) P. K. Sasmal, S. Carregal-Romero, A. A. Han, C. N. Streu, Z. Lin, K. Namikawa, S. L. Elliott, R. W. Köster, W. J. Parak, E. Meggers, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1116–1120; c) T. Völker, F. Dempwolff, P. L. Graumann, E. Meggers, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10536–10540; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 10705–10710.
- [4] Palladium-katalysierte Beispiele: a) R. M. Yusop, A. Unciti-Broceta, E. M. V. Johansson, R. M. Sánchez-Martín, M. Bradley, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 239–243; b) J. T. Weiss, J. C. Dawson, K. G. Macleod, W. Rybski, C. Fraser, C. Torres-Sánchez, E. E. Patton, M. Bradley, N. O. Carragher, A. Unciti-Broceta, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3277; c) J. Li, J. Yu, J. Zhao, J. Wang, S. Zheng, S. Lin, L. Chen, M. Yang, S. Jia, X. Zhang, P. R. Chen, *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 352–361; d) G. Y. Tonga, Y. Jeong, B. Duncan, T. Mizuhara, R. Mout, R. Das, S. T. Kim, Y.-C. Yeh, B. Yan, S. Hou, V. M. Rotello, *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 597–603; For reviews, see: e) J. Li, P. R. Chen, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1728–1731; f) S. V. Chankeswara, E. Indrigo, M. Bradley, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *21*, 128–135.
- [5] Siehe auch: a) K. Tishinov, K. Schmidt, D. Häussinger, D. G. Gillingham, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12000–12004; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 12166–12170; b) Z. Chen, F. Vohidov, J. M. Coughlin, L. J. Stagg, S. T. Arold, J. E. Ladbury, Z. T. Ball, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10138–10145; c) K. K. Sadhu, T. Eierhoff, W. Römer, N. Winssinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20013–20016; d) D. Gillingham, R. Shahid, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *25*, 110–114; e) F. Vohidov, J. M. Coughlin, Z. T. Ball, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4587–4591; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 4670–4674.
- [6] J. J. Soldevila-Barreda, I. Romero-Canelón, A. Habtemariam, P. J. Sadler, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6582.
- [7] a) G. Zlokarnik, *Science* **1998**, *279*, 84–88; b) A. Razgulin, N. Ma, J. Rao, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4186–4216; c) O. V. Makhlynets, I. V. Korendovych, *Biomolecules* **2014**, *4*, 402–418.
- [8] Übersichtsartikel zu gerichteter Evolution: a) S. Lutz, U. T. Bornscheuer, *Protein Engineering Handbook*, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**; b) C. Jäckel, D. Hilvert, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 753–759; c) M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 138–174; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 144–182; d) A. S. Bommarius, J. K. Blum, A. J. Abrahamson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 194–200; e) E. M. Brustad, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 201–210; f) M. Goldsmith, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 406–412; g) M. T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480–12496; h) *Directed Evolution Library Creation: Methods in Molecular Biology* (Hrsg.: E. M. J. Gillam, J. N. Copp, D. F. Ackerley), Humana Press, Totowa, **2014**; i) A. Currin, N. Swainston, P. J. Day, D. B. Kell, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1172–1239; j) C. A. Denard, H. Ren, H. Zhao, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *25*, 55–64.
- [9] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8572–8604.
- [10] L. Narhi, A. Fulco, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 7160–7169.
- [11] Übersichtsartikel zu Modifikationen von P450-Proteinen: a) C. J. C. Whitehouse, S. G. Bell, L.-L. Wong, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1218–1260; b) G.-D. Roiban, M. T. Reetz, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2208–2224.
- [12] a) S. Kille, *Flavoproteins in Directed Evolution—Iterative CASTing to Evolve YqjM and P450_{BM3}*, Ruhr-Universität Bochum, Bochum, **2010**; b) S. Kille, F. E. Zilly, J. P. Acevedo, M. T. Reetz, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 738–743; c) S. Hoebenreich, F. E. Zilly, C. G. A. Rocha, C. G. Acevedo-Rocha, M. Zilly, M. T. Reetz, *ACS Synth. Biol.* **2015**, *4*, 317–331.
- [13] C. A. Müller, A. Dennig, T. Welters, T. Winkler, A. J. Ruff, W. Hummel, H. Gröger, U. Schwaneberg, *J. Biotechnol.* **2014**, *1–9*.
- [14] K. Neufeld, S. M. Zu Berstenhorst, J. Pietruszka, *Anal. Biochem.* **2014**, *456*, 70–81.
- [15] A. Abate, V. Dimartino, P. Spina, P. L. Costa, C. Lombardo, A. Santini, M. Del Piano, P. Alimonti, *Drugs Exp. Clin. Res.* **2001**, *27*, 223–231.
- [16] V. B. Lokeshwar, L. E. Lopez, D. Munoz, A. Chi, S. P. Shirodkar, S. D. Lokeshwar, D. O. Escudero, N. Dhir, N. Altman, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 2613–2623.
- [17] J. G. Deluca, G. R. Dysart, D. Rasnick, M. O. Bradley, *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 1731–1739.
- [18] a) D.-H. Kim, K.-H. Kim, D.-H. Kim, K.-H. Liu, H.-C. Jung, J.-G. Pan, C.-H. Yun, *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 2166–2170; b) S.-H. Park, D.-H. Kim, D. Kim, D.-H. Kim, H.-C. Jung, J.-G. Pan, T. Ahn, D. Kim, C.-H. Yun, *Drug Metab. Dispos.* **2010**, *38*, 732–739; c) A. J. Ruff, A. Dennig, G. Wirtz, M. Blanusa, U. Schwaneberg, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 2724–2728.
- [19] B. M. A. van Vugt-Lussenburg, E. Stjernschantz, J. Lastdrager, C. Oostenbrink, N. P. E. Vermeulen, J. N. M. Commandeur, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 455–461.
- [20] a) N. E. Hopkins, M. K. Foroozesh, W. L. Alworth, *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *44*, 787–796; b) T. N. Waltham, H. M. Girvan, C. F. Butler, S. R. Rigby, A. J. Dunford, R. Holt, A. W. Munro, *Metallobiochemistry* **2011**, *3*, 369–378; c) H. Zhang, S. C. Gay, M. Shah, M. Foroozesh, J. Liu, Y. Osawa, Q. Zhang, C. D. Stout, J. R. Halpert, P. F. Hollenberg, *Biochemistry* **2013**, *52*, 355–364.
- [21] Ergebnisse berichtet für M3 DM-1; R47F/F87A/M354S/D363H/R471C/N543S/R255H.

- [22] a) M. T. Reetz, J. D. Carballeira, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 891–903;
b) C. G. Acevedo-Rocha, S. Hoebenreich, M. T. Reetz, *Methods Mol. Biol.* **2014**, 1179, 103–128.
- [23] I. F. Sevrioukova, H. Li, H. Zhang, J. A. Peterson, T. L. Poulos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 1863–1868.
- [24] a) P. K. Chowdhary, M. Alemseghe, D. C. Haines, *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, 468, 32–43; b) J. Catalano, K. Sadre-Bazzaz, G. A. Amodeo, L. Tong, A. McDermott, *Biochemistry* **2013**, 52, 6807–6815.

Eingegangen am 21. Juli 2015,
veränderte Fassung am 14. August 2015
Online veröffentlicht am 10. September 2015
